Литература

1. Антитела. Методы : пер с англ./ под ред. Д. Кетти. В 2-х кн. М.: Мир, 1991.
2. Бейли, Н. Математика в медицине и биологии / Н. Бейли. М.: Мир, 1970. 326 с.
3. Болезни домашних и сельскохозяйственных птиц / пер с англ.; под ред. Б.У. Кэлнека. М.: Аквариум Бук, 2003. С. 101-119.
4. Бухарин, О.В. Сальмонеллы и сальмонеллезы / О.В. Бухарин, Ю.Д. Каган, А.Л. Бурмистрова. Екатеринбург: УрО РАН, 2000. 257с.
5. Егоров, А.М. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров, А.П. Олепов, Е.М. Гаврилева. М.:Высш. шк., 1991. 288 с.
6. Книрель, Ю.А. Строение липополисахаридов грамотрицательных бактерий. Структура О-специфических полисахаридов / Ю.А. Книрель, Н.К. Кочетков// Биохимия. 1994. Т.59, №12. С. 1784-1851.
7. Aman, A.J. Salmonella in domestic animals / A.J. Aman // J. Immunol. Methods. 1997. Vol.17. P.365.
8. Bredford, M.M. Determination of antigen specificity an indirect ELISA / M.M. Bredford // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P.248-254.
9. Gunnarsson, A. Serologic studies on porcine strain: agglutination reactions / A. Gunnarsson, E.L. Biberstein, B. Hurvell // Am.J. Vet.Res. 1977. Vol. 38, №8. P.1111-1114.
10. Robison, H.F. Microbial diseas / H.F. Robison // Anal. Biochem. 1983. Vol. 64. P.210-214.

УДК 619.615.371

С.Ю. Белов, О.Е. Селина, А.С. Каталымов, О.В. Зиновьева

(ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии (ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии), Покров, Владимирская область; Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (г. Москва, Россия))

МИКРОКАПСУЛИРОВАНИЕ ДНК И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ВИРУСОЛОГИИ

Введение

Микрокапсулирование биологически активных веществ для различных целей в фармацевтической, химической и пищевой промышленности, так же как в сельском хозяйстве, медицине, является актуальным направлением исследований в биотехнологии. Это обусловлено тем, что заключенные в микрокапсулы вещества, а именно лекарственные средства, такие, как антибиотики, ферменты, химиотерапевтические средства, остаются надолго защищенными от внешнего воздействия, тем самым сохраняя свои полезные свойства.

В современной биотехнологии разрабатываются различные способы доставки генетического материала в цитоплазму клетки. J. R. B.Clark и J. March [3] считают перспективным направлением использование бактериофага. Другой путь повысить эффективность адресной доставки биоматериала заключается в применении микрокапсул. Работы, посвященные микрокапсулированию генетического материала (ДНК), пока являются пионерскими. Иммобилизация ДНК в виде микрокапсул дает следующие возможности: 1) позволяет увеличить количество доставляемой в клетку ДНК; 2) легко иммобилизовать специфические лиганды, обеспечивая таким образом их взаимодействие с клеточными рецепторами; 3) использовать несколько ДНК-плазмид или ДНК с белком; 4) защитить ДНК от расщепления нуклеазами. В доступной литературе известно несколько работ, непосредственно касающихся этого вопроса. Так, M. E. Johnson, S. Mossman, T. Cecil, L. Evans [4] заключали ДНК в биосовместимые микросферы, образованные полимерами, позволяющие сохранять ДНК в суперколлоидной форме. Эффективность этого метода микрокасулирования составляла 50%. При попадании их в клетки при инокуляции мышам микрокапсулы деградировали с последующим высвобождением нуклеиновой кислоты. В дальнейших исследованиях была показана высокая эффективность микрокапсулирования при совместном заключении в микросферы ДНК и адъюванта для иммунизации мышей. Разработанный метод микрокапсулирования ДНК авторы предлагают использовать при разработке ДНК-вакцин.

H. Cai с соавторами разрабатывают новую стратегию вакцинации против туберкулеза, применяя биодеградируемые микросферы, содержащие ДНК, кодирующую антигены микобактерий. Учитывая актуальность данного направления в области биотехнологии, цель исследова-

Таблица 1

Эффект введения микрокапсулированной ДНК кроликам

Вид животного	Кол-во	Кол-во ДНК (мкг)	Проявление заболевания	ПЦР	Наличие ЦПД при инфицировании суспезией органов
Кролики	2	6,1	гибель на 4-5 сутки	+	+
	2	6,0	вялотекущая легочная форма, гибель на 21сутки	+печень,мозг, селезенка	+
Кролики, контроль	2	6,0 (некапсулированная ДНК)	не выражена	не выявлено	нет

ния состояла в том, чтобы разработать способ биоинкапсулирования ДНК, который обеспечивал бы достаточно эффективное заключение ДНК в биосовместимые и биодеградируемые микрокапсулы, предохраняющие ее от разрушения в процессе доставки в эукариотические клетки. Разработанный метод микрокапсулирования может быть применен при конструировании ДНК-вакцин как способ доставки генетической информации.

Материалы и методы

В работе использовали вирус болезни Ауески (ВБА) штамм МК-25 8-го пассажа, полученный при инфицировании перевиваемой культуры клеток почки сибирского горного козерога (ПСГК-60). Титр вируса составлял 7,0-7,5 lg $ТЦД_{50}/см^3$.

Для выделения ДНК ВБА концентрировали ПЭГ (ММ 6000) в 100 раз. Выделение и очистку ДНК осуществляли фенольно-детергентным методом. Концентрацию ДНК и степень очистки определяли спектрофотометрически по отношению ОД260/ОД280, которое было в пределах 1,79-1,87 и электрофорезом в полиакриламидном геле.

Заключение ДНК в микрокапсулы проводили согласно разработанному методу, описанному ранее (1). 20-50 мкг ДНК ВБА инкубировали 22 ч с пористыми микрочастицами $CaCO_3$ при 4°С. После инкубации концентрация ДНК в микрочастицах составляла 80-90% от исходной. После адсорбции ДНК микрочастицы дважды отмывали дистиллированной водой. Для образования 1-го слоя оболочки микрочастицы центрифугировали и переносили в раствор низкомолекулярного (30000) поли-L-лизина (2 мг/мл), инкубировали в течение 15 мин на шейкере и дважды отмывали в физиологическом растворе. Для получения 2-го полимерного слоя частицы помещали в раствор альгината (1-2 мг/мл в 0,2М NaCl), инкубировали на шейкере в течение 15 мин, отмывали дважды дистиллированной водой и переносили в раствор 0,1М ЭДТА, интенсивно перемешивали для растворения внутреннего ядра $CaCO_3$ и снова отмывали водой (1000 об/мин 5 мин). Такую последовательность операций повторяли до образования 7 слоев: PLL—Alg—PLL—Alg—PLL—Alg—PLL. Затем микрочастицы переносили в раствор 0,1М ЭДТА, интенсивно перемешивали для растворения ядра $CaCO_3$ и снова отмывали водой (1000 об/мин, 5 мин). Эту операцию повторяли несколько раз до полного растворения ядра $CaCO_3$.

Результаты и обсуждение

Исследовали возможность использования для микрокапсулирования следующие пары противоположно заряженных полиэлектролитов: 1) альгинат/хитозан (модифицированный олигохитозан, растворим при pH 7,5, ММ 6500); 2) хитозан/сульфат хитозана-2 (СХК -2 ММ 74 000, содержание сульфогрупп 14,8%); 3) хитозан/сульфат хитозана-3 (СХК-3, ММ 130 000, содержание сульфогрупп 15,9%); 4) сополимер винилового спирта (ВС) с хитозаном/СХК-2; 6) сополимер ВС с хитозаном/альгинат, 7) хитозан-каррагинан (ММ 400 000); 8) альгинат- поли-L-лизин. Все полимеры и сополимеры являются биосовместимыми и биодеградируемыми, что важно для последующей работы с макроорганизмами.

Микрокапсулы, мембраны которых были образованы на основе пары хитозан/каррагинан и альгинат/поли-L-лизин, обладали наилучшими характеристиками (несильно набухали в воде, имели оптимальный средний размер 1-2 мкм, обладали достаточной механической прочностью) и были выбраны для дальнейших исследований.

ДНК вируса болезни Ауески (ВБА) была выбрана для оценки эффективности переноса ДНК в эукариотические клетки, т.к. ее введение в чувствительную систему приводит к продуктивной вирусной инфекции, которую можно наблюдать как in vivo, так и in vitro.

Таблица 2

Трансфекция клеток ПСГК различными методами

Вносимые реагенты	Время адсорбции (часы)	Количество ДНК (мкг)	Время появления ЦПД (сутки)	Титр вируса на 5 сутки после трансфекции ($lgТЦД_{50}$/мл)
ДЕАЕ-декстрановый метод	2	5-10	-	
Метод с использованием липофектамина	5	5-10	4	1,5
Метод с использованием микрогранул	1	5-10	2	3,5

Были изучены условия сорбции ДНК микросферами $CaCO_3$ при различных концентрациях: 20, 50, 75, 125 мг/см^3. Для изучения сорбции ДНК в порах $CaCO_3$ микрочастиц 20-125 мкг ДНК ВБА инкубировали с 50-100 мг микрочастиц в течение 12 час при 4° С. Полученные микрочастицы с адсорбированной ДНК дважды отмывали дистиллированной водой. При изучении сорбции ДНК в порах $CaCO_3$ установлено, что максимальная сорбция ДНК ВБА из водного раствора составляла 85-90% от начальной концентрации.

Для заключения ДНК в микрокапсулу $CaCO_3$ микрочастицы с сорбированной в них ДНК покрывали мультислойной полимерной мембраной, состоящей из 6 чередующихся слоев: альгинат, поли-L-лизин и т.д., или из полимеров хитозан-каррагинан.

При определении выхода ДНК из микрокапсул было установлено, что из микрокапсул на основе пары хитозан-каррагинан через 1 ч ДНК практически полностью элюировала в водную фазу или спирт, и поэтому микрокапсулы такого состава были не пригодны для микрокапсулирования ДНК. Выход ДНК из микрокапсул на основе пары альгинат/поли-L-лизин в супернатанте не превышал 1% (срок наблюдения 15 дней). Поэтому для дальнейших исследований применяли разработанный метод микрокапсулирования ДНК с использованием пары полимеров альгинат/поли-L-лизин, обеспечивающий включение в микрокапсулы до 90% ДНК. Электронно-микроскопические исследования микрокапсул с заключенной в них ДНК показали, что размер микрокапсул составляет 1-2 мкм, а толщина оболочки 0,2 мкм.

Для оценки разрабатываемого способа доставки генетической информации (ДНК) в клетки животных использовали в качестве модели ДНК вируса болезни Ауески. Это было обусловлено тем, что вирус болезни Ауески (ВБА) является патогенным для кроликов и вызывает заболевание с характерными клиническими признаками, заканчивающееся переболеванием или гибелью животных. Так как ДНК этого вируса является инфекционной, то при сохранении своих биологических свойств и проникновении в чувствительные клетки она должна вызвать инфекционный процесс, который должен проявиться в заболевании животного.

ДНК, заключенную в микрокапсулы, вводили разным группам лабораторных животных: кроликам, морским свинкам, мышам. Контрольным животным инокулировали нативную ДНК в водном растворе. 50% кроликов, которым вводили ДНК в микрокапсулах в количестве 6 мкг, пали на 4 и 5 сутки, а у остальных на 6-7 сутки развилась легочная форма болезни, проявившаяся в чихании, кашле и слизистых выделениях из носа (табл. 1).

Контрольные животные оставались клинически здоровыми. 10% суспензии органов павших и забитых животных исследовали в культуре клеток и методом ПЦР со специфическими праймерами к gp 50 ВБА. Суспензию каждого органа (печень, селезенка, легкие, мозг, кровь) вносили в элективную культуру клеток ПСГК-60, выращенную в культуральных сосудах, и культивировали при 37° С. На 4-5 сутки наблюдали цитопатический эффект только во флаконах, которые были инокулированы материалом, взятым от животных, которым вводили микрокапсулированную ДНК.

Методом ПЦР со специфическими праймерами выявлена ДНК вируса болезни Ауески в печени и мозге, а также в культуральном материале, инфицированном суспензией печени и мозга животных, которым вводили ДНК в микрокапсулах. В контрольной группе ДНК ВБА в суспензии органов и культуральном материале не выявляли. Аналогичные опыты были проведены на мышах и морских свинках.

С целью оценки доставки генетической информации микрокапсулами in vitro осуществляли трансфекцию клеток ПСГК-60 ВБА тремя методами (табл. 2): ДЕАЕ-декстрановым, с использованием липофектамина и с помощью микрогранул. В пробах

с культурой клеток, в которых осуществляли трансфекцию с помощью микрогранул, развитие цитопатического действия (ЦПД), характерного для ВБА, обнаруживали уже на 2-е сутки, в то время как в других образцах появление ЦПД не наблюдали. На 4-е сутки ЦПД было обнаружено в культуре клеток, трансфекцию в которых осуществляли с использованием липофектамина. На культуре клеток с ДЕАЕ-декстраном ЦПД не наблюдали в течение 6 дней (срок наблюдения). Полученный цитопатический эффект был обусловлен вирусом болезни Ауески, что подтверждено также методом ПЦР со специфическими праймерами к gp 50, размер ПЦР-продукта составлял 492 п.о.

Таким образом, разработан метод микрокапсулирования ДНК, состоящий из следующих этапов: 1) сорбция ДНК пористыми микрочастицами $CaCO_3$ при 4° С 20-24 часа; 2) нанесение полимерных слоев Alg- PLL-Alg- PLL-Alg- PLL; 3) растворение внутреннего ядра $CaCO_3$; 4)отмывание микрокапсул с заключенной в них ДНК.

Выводы

Проведенные исследования показали, что разработанный метод микрокапсулирования ДНК путем послойной адсорбции противоположно заряженных биодеградируемых полиэлектролитов на сферические макропористые микрочастицы $CaCO_3$ может быть использован для доставки генетического материала (нуклеиновой кислоты) в эукариотические клетки in vivo и in vitro. Разработанный метод микрокапсулирования может быть использован при конструировании ДНК-вакцин.

Работа выполнена по проекту РФФИ 06-04-08-277

РЕЗЮМЕ

Работа относится к области нанотехнологий и технологиям соматической генной терапии. Представлены результаты получения микрокапсул с регулируемыми параметрами (диаметр, толщина оболочки, состав и проницаемость мембраны) и иммобилизации в них ДНК вируса болезни Ауески. Микрокапсулирование ДНК может быть использовано как способ доставки ДНК-вакцин.

SUMMARY

The area of nanotechnologies and somatic gene therapy technologies is considered. The paper demonstrates results of generation of microcapsules having regulated properties (diameter, capsule thickness, membrane composition and permeability) and the results of Aujeszky's disease viral DNA immobilization in these microcapsules. The DNA microcapsulation can be used for DNA-vaccine delivery.

Литература

1. Микрокапсулирование ДНК как способ доставки ДНК вакцин /В.И. Балышева, Н.Н.Власова, О.Е. Селина, [и др.] // Росс. вет. журн. Мелкие домашние и дикие животные. 2007. №1. С. 25-26.
2. Combined DNA vaccine encapsulated in microspheres enhanced protection efficacy against Mycobacterium tuberculosis infection of mice /H. Cai, X.D. Hu, D.H. Hu, [et al.] //Vaccine.2005. Vol. 23. P. 4167-4174.
3. Clark, J.R. Bacterialvirusis as human vaccinsFuture drugs /J.R. Clark, J.B. March //Expert Rev. Vaccines. 2004. Vol. 3,4. P. 463-476
4. Johnson M. E., Mossman S., Cecil T., Evans L. Patent No.:US 2002/0032165 A1 Mar.14, 2002.

УДК 619:619.98:579.842.14

И.А. Степанова, О.В. Бородина, Ф.А. Ширяев

ПЕРСИСТЕНЦИЯ САЛЬМОНЕЛЛ В ОРГАНИЗМЕ ВАКЦИНИРОВАННЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ

Введение

Сальмонеллез – инфекционное контагиозное заболевание многих видов домашних, диких животных и птиц, широко распространенное среди сельскохозяйственных животных, наносящее большой ущерб животноводству и представляющее угрозу здоровью людей [1, 6].

Возбудители сальмонеллеза могут вызывать как первичные инфекции (брюшной тиф человека, сальмонеллезы молодняка животных, пуллороз птиц), так и вторичные, осложняющие бактериальные и вирусные болезни (пневмонии молодняка, чума свиней). У людей они вызывают пищевые токсикоинфекции при употреблении инфицированных продуктов животного происхождения [2, 3].

Домашняя птица, свиньи, крупный рогатый скот являются основным резервуаром инфекции, а продукты питания животного происхождения – источником зараже-